

Rec'd PCT/PTO 11 JUL 2005

PCT/JP 2004/000254

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

15. 1. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 1月15日

REC'D 05 MAR 2004

出願番号
Application Number: 特願2003-007122
[ST. 10/C]: [JP 2003-007122]

WIPO PCT

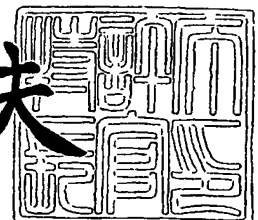
出願人
Applicant(s): 杉山 治夫
中外製薬株式会社
住友製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3010820

【書類名】 特許願

【整理番号】 186844

【提出日】 平成15年 1月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/00
A61K 35/12

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

【氏名】 高須 秀夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

【氏名】 三溝 文雄

【特許出願人】

【識別番号】 595090392

【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西2-19-30

【氏名又は名称】 杉山 治夫

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100086405

【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100103230

【弁理士】

【氏名又は名称】 高山 裕貢

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0203207

【包括委任状番号】 9809450

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二量体化ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも 1 つのシステイン残基を含みかつ 7 ～ 30 個のアミノ酸残基からなる、CTL 誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる 2 つのペプチド単量体が相互にジスルフィド結合により結合しているペプチド二量体。

【請求項 2】 CTL 誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる、請求項 1 に記載のペプチド二量体。

【請求項 3】 2 つのペプチド単量体が 1 または 2 個のジスルフィド結合により結合している、請求項 1 または 2 に記載のペプチド二量体。

【請求項 4】 ペプチド単量体が癌抑制遺伝子産物 WT1 に由来する、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のペプチド二量体。

【請求項 5】 ペプチド単量体が Cys Xaa Thr Trp Asn Gln Met Asn Xaa (配列番号: 72) (第 2 位の Xaa は、Tyr、Phe、Met および Trp からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸残基を示し、第 9 位の Xaa は、Phe、Leu、Ile、Trp および Met からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸残基を示す) である請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のペプチド二量体。

【請求項 6】 ペプチド単量体が Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 11)、Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe (配列番号: 18)、Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr (配列番号: 19)、Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu (配列番号: 20)、Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号: 21)、Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号: 22)、Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu (配列番号: 23) および Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 44) からなる群より選ばれる、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のペプチド二量体。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のペプチド二量体と薬学的に許容されうる担体とを含有してなる医薬組成物。

【請求項 8】 癌ワクチンとして使用される、請求項 7 に記載の医薬組成物

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、癌ワクチン療法の分野に属し、詳細には細胞傷害性 T 細胞誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせるペプチド二量体およびそれを含有する医薬組成物に関する。

【0002】**【従来の技術】**

生体による癌細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性 T 細胞（以下、CTL と称する）が重要な働きをしている。CTL は、癌細胞上の癌抗原タンパク質由来の抗原ペプチド（癌抗原ペプチド）と MHC（Major Histocompatibility Complex）クラス I 抗原（ヒトの場合は HLA 抗原と称する）とにより形成される複合体を認識し、癌細胞を攻撃・破壊する。

【0003】

癌抗原タンパク質は、Immunity, vol.10:281, 1999の表中に記載のものが代表例として挙げられる。具体的には、メラノサイト組織特異的タンパク質である gp100（非特許文献1を参照）、MART-1（非特許文献2を参照）、およびチロシナーゼ（非特許文献3を参照）などのメラノソーム抗原、ならびにメラノーマ以外の癌抗原タンパク質としてHER2/neu（非特許文献4を参照）、CEA（非特許文献5を参照）、およびPSA（非特許文献6を参照）などの癌マーカーがある。

【0004】

癌抗原ペプチドは、癌抗原タンパク質が細胞内プロテアーゼによりプロセシングされて生成される約8から11個のアミノ酸から成るペプチドである（非特許文献7～10を参照）。前記のように、この生成された癌抗原ペプチドとMHCクラスI抗原（HLA抗原）との複合体が細胞表面に提示され、CTLにより認識される。従って、CTLによる癌細胞破壊を利用する癌免疫療法剤（癌ワクチン）を開発する場合、CTLを効率良く誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タン

パク質から同定することが、非常に重要となる。

【 0 0 0 5 】

【特許文献 1】

特開平 9 - 1 0 4 6 2 7 号公報

【特許文献 2】

国際公開第 00/06602 号パンフレット

【特許文献 3】

国際公開第 00/18795 号パンフレット

【非特許文献 1】

J. Exp. Med., 179:1005, 1994

【非特許文献 2】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3515, 1994

【非特許文献 3】

J. Exp. Med., 178:489, 1993

【非特許文献 4】

J. Exp. Med., 181:2109, 1995

【非特許文献 5】

J. Natl. Cancer. Inst., 87:982, 1995

【非特許文献 6】

J. Natl. Cancer. Inst., 89:293, 1997

【非特許文献 7】

Cur. Opin, Immunol., 5:709, 1993

【非特許文献 8】

Cur. Opin, Immunol., 5:719, 1993

【非特許文献 9】

Cell, 82:13, 1995

【非特許文献 1 0】

Immunol. Rev., 146:167, 1995

【非特許文献 1 1】

: 72) (第2位のXaaは、Tyr、Phe、MetおよびTrpからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示し、第9位のXaaは、Phe、Leu、Ile、TrpおよびMetからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示す)である、上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチド二量体:

(6) ペプチド単量体がCys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 11)、Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe (配列番号: 18)、Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr (配列番号: 19)、Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu (配列番号: 20)、Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号: 21)、Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号: 22)、Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu (配列番号: 23) およびCys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 44) からなる群より選ばれる、上記(1)～(4) いずれかに記載のペプチド二量体;

(7) 上記(1)～(6)のいずれかに記載のペプチド二量体と薬学的に許容されうる担体とを含有してなる医薬組成物; および

(8) 癌ワクチンとして使用される、上記(7)に記載の医薬組成物; に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明のペプチド二量体は、2つのペプチド単量体間における少なくとも1対のシステイン残基のSH基間でのジスルフィド結合によって2つの単量体が相互に結合して二量体化している。

本発明のペプチド二量体は、抗原提示細胞等における生体内分解により、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞(CTL)により認識される癌抗原ペプチドを生じさせる。本発明のペプチド二量体はCTLの誘導能を有するものであり、誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗癌作用を発揮することができる。従って本発明の二量体は、癌の治療または予防のための癌ワクチンに使用することができる。

【0010】

本発明のペプチド二量体を構成するペプチド単量体は、少なくとも1つのシス

テイン残基を含みかつ7～30個のアミノ酸残基からなり、そしてCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる。「癌抗原ペプチドを生じさせる」とは、ペプチド単量体が細胞内分解により、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞(CTL)により認識される癌抗原ペプチドを生じる」という特性を有する意味である。ペプチド単量体は、それ自身CTL誘導活性を有している限り特に制限されるものではないが、多くの癌種で高発現しているヒトWilms癌の癌抑制遺伝子WT1(Cell., 60:509, 1990(非特許文献12)、NCBIデータベースAccession No.XP_034418、配列番号:1)に由来しかつシステイン残基を少なくとも1つ含有するものが好ましい。WT1遺伝子は、Wilms癌、無紅彩、泌尿生殖異常、精神発達遅延などを合併するWAGR症候群の解析からWilms癌の原因遺伝子の1つとして染色体11p13から単離され(非特許文献11を参照)、そのゲノムDNAは約50kbであり10のエキソンから成り、そしてそのcDNAは約3kbである。cDNAから推定されるアミノ酸配列は、配列番号:1に示す通りである(非特許文献12)。WT1遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞をWT1アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される(特許文献1を参照)ことなどから、WT1遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT1遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており(特許文献1および2を参照)、白血病および固形癌における新しい癌抗原タンパク質であることが判明した(非特許文献13および非特許文献14を参照)。癌免疫療法(癌ワクチン)は多くの癌患者に対して適用可能であることが好ましいことから、多くの癌種で高発現しているWT1における癌抗原ペプチドの同定、および当該癌抗原ペプチドを利用した癌ワクチンの開発は重要である。これに関し、特許文献2および特許文献3には、WT1タンパク質の部分から成る幾つかの天然型の癌抗原ペプチドが記載されているが、イン・ビボでの効果は知られていない。

【0011】

本発明に用いられる他のペプチド単量体としては、Immunity, vol.10:281, 1999の表中に記載の癌抗原タンパク質由来の癌抗原ペプチドでありかつシステイン

残基を少なくとも1つ含有するものが挙げられる。

【0012】

C T L誘導活性は、H L Aテトラマー法 (Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002)) または限界希釈法 (Nat. Med. :4, 321-327 (1998)) により C T L の数を測定することにより確認することができる。あるいは、例えばHLA-A24拘束性のC T L誘導活性の場合、国際公開第02/47474号パンフレットおよびInt. J. Cancer : 100, 565-570 (2002) に記述されたHLA-A24モデルマウスを用いることなどにより調べることができる。

【0013】

ペプチド単量体のアミノ酸残基の個数は7～30個であるが、8～12個が好ましく、9～11個がより好ましい。ペプチド単量体中のシステイン残基の数は、H L A との結合モチーフとペプチドの長さとを考慮し、1または2個であることが好ましい。

【0014】

ペプチド単量体は、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ (The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善 (株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

【0015】

得られたペプチド単量体は、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて分子間でジスルフィド結合を形成することができる。ジスルフィド結合の形成方法は、文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ (The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善 (株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

【0016】

具体的には、ペプチド単量体に含まれるシステイン残基が1個の場合、システイン側鎖の保護基を含むすべての保護基を除去した後、ペプチド単量体を含む溶液をアルカリ条件下で空気酸化反応に付す方法、あるいは、アルカリ性または酸性条件下酸化剤を添加してジスルフィド結合を形成する方法などが挙げられる。ここで、酸化剤としては、ヨウ素、ジメチルスルホキシド (DMSO)、フェリシアン化カリウムなどが挙げられる。

【0017】

システイン残基が2個以上の場合も、前記と同様の方法を用いることができる。この場合はジスルフィド結合様式が異なる異性体が得られる。システイン側鎖の保護基を特定な組み合わせにすることにより、目的のシステイン残基間でジスルフィド結合を形成した二量体を得ることができる。前記保護基の組み合わせとしては、MeBzl (メチルベンジル) 基とAcM (アセトアミドメチル) 基、Trt (トリチル) 基とAcM基、Npys (3-ニトロ-2-ピリジルチオ) 基とAcM基、S-Bu-t (S-tert-ブチル) 基とAcM基などが挙げられる。例えばMeBzl基とAcM基の組み合わせの場合、まずMeBzl基とシステイン側鎖以外のその他の保護基を除去した後、ペプチド単量体を含む溶液を空気酸化反応に付して脱保護されたシステイン残基間にジスルフィド結合を形成し、次いでヨウ素による脱保護および酸化を行ってAcM基で保護されていたシステイン残基間にジスルフィド結合を形成する方法などが挙げられる。

【0018】

得られたペプチド二量体は、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて精製することができる。ペプチド二量体の精製方法は、文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ (The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善 (株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されているが、HPLCが好ましい。

【0019】

このようにして得られた本発明のペプチド二量体は、システイン残基がジスルフィド結合を形成していることにより、溶液中での酸化剤等に対する安定性に優れており、医薬品原料として一定の品質とCTLの誘導活性を保持するものである。

【0020】

本発明に用いられるペプチド単量体の好ましい具体例としてWT1を例に以下に示す。なお、表中、「位置」とは配列番号1に記載のヒトWT1におけるペプチドの位置を示す。

【表1】

HLA-A1 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
137-145	CLESQPAIR	2
80-88	GAEPHEEQC	3
354-362	QCDFKDCER	4
409-417	TSEKPFSCR	5
386-394	KTCQRKFSR	6
325-333	CAYPGCNKR	7
232-240	QLECMTWNQ	8
317-325	TSEKRPFMC	9

【0021】

【表 2】

HLA-A0201 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
280-288	ILCGAQYRI	10
235-243	CMTWNQMNL	11
227-235	YQMTSQLEC	12
408-416	KTSEKPFSC	13
228-236	QMTSQLECM	14
86-94	EQCLSAFTV	15

【0022】

【表 3】

HLA-A0205 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
235-243	CMTWNQMNL	11
227-235	YQMTSQLEC	12
194-202	SVPPPVGVC	16
280-288	ILCGAQYRI	10
81-89	AEPHEEQCL	17

【0023】

【表 4】

HLA-A24 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
356-364	DFKDCERRF	18
326-334	AYPGCKRY	19
130-138	NAPYLPSC	20
329-337	GCNKRYFKL	21
417-425	RWPSCQKKF	22
207-215	DSCTGSQAL	23
235-243	CMTWNQMNL	11
235*-243	CYTWNQMNL	44

*:配列番号 11 において、236 位MをYに改変

【0024】

【表 5】

HLA-A3 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
88-96	CLSAFTVHF	24
137-145	CLESQPAIR	2
280-288	ILCGAQYRI	10
386-394	KTCQRKFSR	6
235-243	CMTWNQMNL	11
383-391	FQCKTCQRK	25
194-202	SVPPPVYGC	16

【0025】

【表 6】

HLA-A68.1 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
100-108	FTGTAGACR	26
386-394	KTCQRKFSR	6
409-417	TSEKPFSCR	5
325-333	CAYPGCNKR	7
354-362	QCDFKDCER	4
324-332	MCAYPGCNK	27
379-387	GVKPFQCKT	28
137-145	CLESQPAIR	2

【0026】

【表 7】

HLA-A1101 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
386-394	KTCQRKFSR	6
383-391	FQCKTCQRK	25
100-108	FTGTAGACR	26
324-332	MCAYPGCNK	27
415-423	SCRWPSCQK	29
137-145	CLESQPAIR	2
325-333	CAYPGCNKR	7

【0027】

【表 8】

HLA-A3101 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
386-394	KTCQRKFSR	6
137-145	CLESQPAIR	2
100-108	FTGTAGACR	26
325-333	CAYPGCNKR	7
279-287	PILCGAQYR	30
354-362	QCDFKDCER	4
383-391	FQCKTCQRK	25
358-366	KDCERRFSR	31

【0028】

【表 9】

HLA-A3302 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
409-417	TSEKPFSCR	5
137-145	CLESQPAIR	2
354-362	QCDFKDCER	4
100-108	FTGTAGACR	26
325-333	CAYPGCNKR	7
207-215	DSCTGSQAL	23
419-427	PSCQKKFAR	32

【0029】

【表 10】

HLA-B14 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
329-337	GCNKRYFKL	33

【0030】

【表 11】

HLA-B40 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
81-89	AEPHEEQCL	17
410-418	SEKPFSCRW	34
318-326	SEKRPFMCA	35
233-241	LECMTWNQM	36
349-357	GEKPYQCDF	37
85-93	EEQCLSAFT	38
23-31	GCALPVSGA	39
206-214	TDSC TGSQA	40
24-32	CALPVSGAA	41
84-92	HEEQCLSAF	42

【0031】

【表 1 2】

HLA-B60 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
81-89	AEPHEEQCL	17
233-241	LECMTWNQM	36
209-217	CTGSQALLL	43
318-326	SEKRPFMCA	35
329-337	GCKRYFKL	33
130-138	NAPYLPSC	20
85-93	EEQCLSAFT	38
208-216	SCTGSQALL	45
207-215	DSCTGSQAL	23
18-26	LGGGGGCAL	46

【 0 0 3 2】

【表 1 3】

HLA-B61 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
318-326	SEKRPFMCA	35
81-89	AEPHEEQCL	17
233-241	LECMTWNQM	36
85-93	EEQCLSAFT	38
206-214	TDSCCTGSQA	40
20-28	GGGGCALPV	47
23-31	GCALPVSGA	39

【 0 0 3 3】

【表 14】

HLA-B62 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
88-96	CLSAFTVHF	24
17-25	SLGGGGGCA	48
384-392	QCKTCQRKF	49
227-235	YQMTSQLEC	12
86-94	EQCLSAFTV	15
101-109	TGTAGACRY	50
280-288	ILCGAQYRI	10

【0034】

【表 15】

HLA-B7 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCL	20
208-216	SCTGSQALL	45
18-26	LGGGGGCAL	46
207-215	DSCTGSQAL	23
209-217	CTGSQALLL	43
329-337	GCNKRYFKL	33
235-243	CMTWNQMNL	11

【0035】

【表 16】

HLA-B8 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
329-337	GCNKRYFKL	33
208-216	SCTGSQALL	45
130-138	NAPYLPSCL	20
420-428	SCQKKFARS	51
387-395	TCQRKFSRS	52
207-215	DSCTGSQAL	23
384-392	QCKTCQRKF	49
136-144	SCLESQPAI	53
347-355	HTGEKPYQC	54

【0036】

【表 17】

HLA-B2702 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
416-424	CRWPSCQKK	55
107-115	CRYGPFGPP	56

【0037】

【表 18】

HLA-B2705 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
416-424	CRWPSCQKK	55
388-391	FQCKTCQRK	25

【0038】

【表 19】

HLA-B3501 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
278-286	TPILCGAQY	57
327-335	YPGCNKRYF	58
82-90	EPHEEQCLS	59
207-215	DSCTGSQAL	23
412-420	KPFSCRWPS	60

【0039】

【表 20】

HLA-B3701 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
81-89	AEPHEEQCL	17
85-93	EEQCLSAFT	38
208-216	SCTGSQALL	45
209-217	CTGSQALLL	43
206-214	TDSCGTGSQA	40
84-92	HEEQCLSAF	42
233-241	LECMTWNQM	36
349-357	GEKPYQCDF	37

【0040】

【表 21】

HLA-B3801 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
202-210	CHTPTDSCT	61
417-425	RWPSCQKKF	22
327-335	YPGCNKRYF	58
208-216	SCTGSQALL	45
18-26	LGGGGGCAL	46
83-91	PHEEQCLSA	62

【0041】

【表 2 2】

HLA-B3901 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
136-144	SCLESQPAI	53
208-216	SCTGSQALL	45
207-215	DSCTGSQAL	23

【0042】

【表 2 3】

HLA-B3902 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCL	20
209-217	CTGSQALLL	43
207-215	DSCTGSQAL	23
208-216	SCTGSQALL	45
329-337	GCNKRYFKL	33

【0043】

【表 2 4】

HLA-B4403 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
349-357	GEKPYQCDF	37
84-92	HEEQCLSAF	42
410-418	SEKPFSCRW	34
278-286	TPILCGAQY	57
318-326	SEKRPFMCA	35
81-89	AEPHEEQCL	17
101-109	TGTAGACRY	50
85-93	EEQCLSAFT	38
233-241	LECMTWNQM	36
104-112	AGACRYGPF	63

【0044】

【表 2 5】

HLA-B5101 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCCL	20
20-28	GGGGCALPV	47
18-26	LGGGGGCAL	46
418-426	WPSCQKKFA	64
82-90	EPHEEQCLS	59
280-288	ILCGAQYRI	10
204-212	TPTDSCTGS	65

【0045】

【表 2 6】

HLA-B5102 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCSL	20
20-28	GGGGCALPV	47
412-420	KPFSCRWPS	60
18-26	LGGGGGCAL	46
24-32	CALPVSGAA	66
136-144	SCLESQPAI	53
418-426	WPSCQKKFA	64
351-359	KPYQCDFKD	67

【0046】

【表 2 7】

HLA-B5201 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
86-94	EQCLSAFTV	15
20-28	GGGGCALPV	47
327-335	YPGCNKRYF	58
104-112	AGACRYGPF	63

【0047】

【表 28】

HLA-B5801 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
230-238	TSQLECMTW	68
408-416	KTSEKPFSC	13
276-284	HTTPILCGA	69
347-355	HTGEKPYQC	54
317-325	TSEKRPFMC	9

【0048】

【表 29】

HLA-CW0301 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
329-337	GCNKRYFKL	21
24-32	CALPVSGAA	41
136-144	SCLESQPAI	53
130-138	NAPYLPACL	20

【0049】

【表 3 0】

HLA-CW0401 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
356-364	DFKDCERRF	18
327-335	YPGCNKRYF	58
326-334	AYPGCNKRY	19
417-425	RWPSCQKKF	22
278-286	TPILCGAQY	57
99-107	QFTGTAGAC	70

【 0 0 5 0】

【表 3 1】

HLA-CW0602 拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCL	20
319-327	EKRPFMCAY	71
207-215	DSCTGSQAL	23

【 0 0 5 1】

【表 3 2】

HLA-CW0702拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
319-327	EKRPFMCAY	71
326-334	AYPGCNKRY	19
278-286	TPILCGAQY	57
327-335	YPGCNKRYF	58
101-109	TGTAGACRY	50
130-138	NAPYLPSCSL	20
84-92	HEEQCLSAF	42

【0052】

HLA分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性（結合モチーフ）が存在することが知られている。HLA-A24の結合モチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン（Tyr）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）またはトリプトファン（Trp）であり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン（Phe）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、トリプトファン（Trp）またはメチオニン（Met）となることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994）。従って、上記表4に示すペプチド単量体に加え、ペプチド単量体がCys Xaa Thr Trp Asn Gln Met Asn Xaa（配列番号：72）（第2位のXaaは、Tyr、Phe、MetおよびTrpからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示し、第9位のXaaは、Phe、Leu、Ile、TrpおよびMetからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示す）であるペプチドも、HLA-A24拘束性ペプチド単量体として好適に用いられる。

【0053】

またHLA-A0201の結合モチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がロイシン（Leu）またはメチオニン（Met）であり、C末端の

アミノ酸がバリン(Val)またはロイシン(Leu)となることが知られている。HLA-A0205の結合モチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がバリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)またはメチオニン(Met)であり、C末端のアミノ酸がロイシン(Leu)となることが知られている(Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155: p4749, 1995)。従って、上記表2または3に示すペプチド単量体の第2位のアミノ酸またはC末端のアミノ酸を上記モチーフのいずれかに置換したペプチドもHLA-A0201またはHLA-A0205拘束性ペプチド単量体として好適に用いられる。

【0054】

上記表4に示すペプチド単量体が本発明においては特に好適に用いられる。表4中、配列番号：44のペプチドは、配列番号：11(235～243位)のアミノ酸配列において236位のメチオニンをチロシンに改変した非天然の改変型ペプチドである。よって、本発明におけるペプチド単量体には、天然型ペプチド中のシステイン残基以外の残基を一部改変したペプチドであって、CTLの誘導活性を有するペプチドも含まれる。

【0055】

本発明は別の態様として、本発明のペプチド二量体と薬学的に許容されうる担体とを含有する医薬組成物を提供する。医薬組成物中の有効成分であるペプチド二量体の量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～20mgである。

本発明医薬組成物には有効成分として、本発明ペプチド二量体だけでなく、ペプチド単量体を含むことができる。本発明医薬組成物中に含まれる「ペプチド二量体」の割合は、CTLの誘導活性をもたらす限り特に制限されるものではないが、全ペプチド中50%以上であり、70～100%が好ましく、80～100%がより好ましい。ペプチド二量体の割合は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により確認することができる。

【0056】

薬学的に許容されうる担体は、細胞性免疫を増強する作用を有するものである

。当該担体としては、例えばアジュバントが挙げられる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、サイトカイン、植物由来成分、水酸化アルミニウム如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液 (エマルジョン製剤) などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤などの製剤化に必要な成分も担体に含まれる。

【0057】

本発明医薬組成物の投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。CTL を効率よく誘導する皮内投与や皮下投与が好ましい。投与回数および投与間隔は、治療または予防目的の疾患、患者の個体差により適宜調整することができるが、通常複数回であり、数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。

【0058】

例えば、WTI 由来のペプチド単量体から構成されるペプチド二量体を含有する本発明医薬組成物を WTI 陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞の HLA 抗原にペプチドが提示され、提示された HLA 抗原複合体特異的 CTL が増殖して癌細胞を破壊することができ、従って、癌の治療または予防が可能となる。本発明の医薬組成物は、WTI 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

本発明はさらに別の態様として、本発明の医薬組成物を WTI 陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

【0059】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによりなんら限定されるものではない。

【0060】

製造例 1

1. 保護ペプチド樹脂(H-Cys(Trt)-Tyr(Trt)-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Met-Asn(Trt)-Leu-Alko-Resin)の合成

Fmoc-Leu-Alko-樹脂(ここに、Alkoはp-アルコキシベンジルアルコール) 12g(渡辺化学製; 0.81mmol/g)をAdvanced ChemTech社製ACT90型固相合成機の500ml反応槽内に入れ、一旦この樹脂をDMF等で洗浄後(工程1)、25%Pip(ピペリジン)で処理(3分×1回及び15分×1回)してFmoc基を切断後(工程2)、再びDMF等で樹脂を洗浄し(工程1)、Pipを除去した。この反応槽内に、Fmoc-Asn(Trt)-OH 29.36gとHOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール) 7.5gをNMP(N-メチルピロリジノン) 150mlに溶解した溶液を加え、更にDIPCI(N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド) 7.6mlを加えて30分間室温撹拌を行った(工程3)。30分後、NMPで樹脂を洗浄し(工程4)、Fmoc-Asn(Trt)-OH 29.36gとHOBt 7.5gを用いて再度カップリング反応を行い(工程5)、Fmoc-Asn(Trt)-Leu-Alko樹脂を合成した。その後、工程2の脱保護操作を行い、H-Asn(Trt)-Leu-Alko-樹脂とした。次いで、工程1の洗浄操作を行い、Fmoc-Met-OH 18.27g、Fmoc-Gln(Trt)-OH 30.04g、Fmoc-Asn(Trt)-OH 29.36g、Fmoc-Trp(Boc)-OH 25.91g、Fmoc-Thr(tBu)-OH 19.56g、Fmoc-Tyr(tBu)-OH 22.60g、Fmoc-Cys(Trt)-OH 28.82gを順次加え、工程3のカップリング反応を行った。但しFmoc-Thr(tBu)-OHについてはカップリングを3回繰り返して行った後、得られた樹脂をDMFで洗浄後、25%AC₂O(無水酢酸)で15分×2回で未反応のアミノ基をキャッピングした。N末端のFmoc-Cys(Trt)-OHを縮合後、工程2の脱保護操作を行い、工程6の洗浄操作を実施し、H-Cys(Trt)-Tyr(Trt)-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Met-Asn(Trt)-Leu-Alko-Resinを得た。上記合成工程の概要を表33に示す。

【表 33】

<合成工程>

工程	試薬	処理回数	時間(分)
1) 洗浄	DMF	100ml ×6	0.3
	MeOH	100ml ×1	0.3
	DMF	100ml ×3	0.3
2) 脱保護	25% ピペリジン/DMF	100ml	3.0
		100ml	15.0
3) カップリング	各アミノ基保護アミノ酸 (5 当量)	30×1	
	HOBT (5 当量) DIPCI (5 当量) /NMP	150ml	
4) 洗浄	NMP	100ml×2	0.3
5) カップリング	各アミノ基保護アミノ酸 (5 当量)	30×1	
	HOBT (5 当量) DIPCI (5 当量) /NMP	150ml	
6) 洗浄	DMF	100ml ×5	0.3
	MeOH	100ml ×1	0.3
	DMF	100ml ×2	0.3

【0061】

2. 保護ペプチド樹脂の脱保護

上記操作によって得られた保護ペプチド樹脂(H-Cys(Trt)-Tyr(Trt)-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Met-Asn(Trt)-Leu-Alko-Resin 14.06gにReagent K (5%フェノール/ 5%チオアニソール/5%H₂O/2.5%エタンジチオール/TFA溶液)100mlとトリイソプロピルシラン (TIPS) 15mlを加え、室温で2.5時間攪拌した。その後、ジエチルエーテル約500mlを加え、ガラスフィルターで濾過を行い、Reagent Kとジエチルエーテルを濾液として除いた。濾上物を約100mlのジエチルエーテルで3回洗浄し、洗浄後の濾上物に約100mlのTFAを加える操作を3回繰り返して行

い、目的物を含む濾液を約300ml得た。この濾液を濃縮してTFAを除き、アセトニトリル約50mlと20%酢酸水約250ml加え凍結乾燥し、パウダー状の粗ペプチド(H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH、配列番号: 44)6.12gを得た。

【0062】

3. 粗ペプチドの精製

得られた粗ペプチド749mgをTFA 10mlに溶解し、HPLC(Shimazu製; LC8AD型) 1液=H₂O/0.1%TFAで平衡化しているYMC社製 ODS C₁₈ 5cmΦ×50cmLのカラムにHPLCのポンプでチャージした。その状態で約30分間保ち、30分後、2液=CH₃CN/0.1%TFAの濃度を30分間で0%から15%迄上昇した。その後、更に330分かけて28%まで2液の濃度を上昇させ、目的とするペプチドの溶出液を220nmのUVでモニターしながら、目的物を含む分画を集めた。集めた分画を、YMC社製ODS C₁₈ 4.6mmΦ×25cmLカラムをセットしたHPLC(日立製 L-4000型)で1液=H₂O/0.1%TFAと2液=CH₃CN/0.1%TFAの溶出液で、2液=CH₃CN/0.1%TFAの濃度を17%で平衡化しているカラムに注入し、220nmのUVでモニターしながら2液の濃度47%まで30分間で上昇させ、保持時間14.79分の目的ペプチド単量体の精製品227.5mgを得た。

【0063】

・アミノ酸分析

加水分解: 1%フェノール/6N塩酸水、110℃ 10時間

分析法: ニンヒドリン法

Asx:1.71(2) Thr:0.75(1) Glx:1.07(1) Met:0.91(1) * Leu:(1) Tyr:0.82(1)

*) Leu=基準アミノ酸 () 内 理論値

・質量分析: LC/MS M⁺₁=1173.0 (理論値=1172.36)

・アミノ酸配列分析: N末2残基目 Tyrから、C末Leuまで順次確認した。

【0064】

実施例 1

次式で示される二量体の合成:

【化1】

C-Y-T-W-N-Q-M-N-L-OH

|

C-Y-T-W-N-Q-M-N-L-OH

製造例 1 により得られたペプチド単量体 227.5mg、N-メチルグルカミン (NMG) 227.5mg、水 23ml を加え室温で約 2 日間攪拌することにより、空気酸化を行った。その後、反応液中に酢酸ナトリウム 2g を水 5ml に溶解した水溶液を加え約 20 分間室温攪拌を行い、更に水 200ml とアセトニトリル約 200ml を加えた後、桐山ロート (ろ紙 No5C) で濾過し、濾上物を水 (約 50ml×3 回) で洗浄した。濾上物を濾取し、水約 200ml を加えて凍結乾燥を行い、目的とする粗ペプチド二量体 158mg を得た。

【0065】

粗ペプチド二量体の精製

粗ペプチド二量体 158mg を DMSO 9ml に溶解し、HPLC (Shimazu 製; LC8AD 型) に 1 液 = H₂O/1%AcOH で平衡化している YMC 社製 ODS C₁₈ 5cmΦ×50cmL のカラムに HPLC のポンプでチャージした。その状態で約 30 分間保ち、30 分後、2 液 = CH₃CN/1%AcOH の濃度を 360 分間で 0% から 40% 迄上昇した。その後、目的とする二量体の溶出液を 220nm の UV でモニターしながら、自動分画装置により目的物を含む分画を集めた。集めた分画を、YMC 社製 ODS C₁₈ 4.6mmΦ×25cmL カラムをセットした HPLC (日立製 L-4000 型) で 1 液 = H₂O/0.1%TFA と 2 液 = CH₃CN/0.1%TFA の溶出液で、2 液 = CH₃CN/0.1%TFA の濃度を 17% で平衡化しているカラムに注入し、220nm の UV でモニターしながら 2 液の濃度を 0% から 47% まで 30 分で上昇させ、保持時間 20.51 分の目的とするペプチド二量体精製品 46.6mg を得た。

FAB.MS 2365.0 (理論値 2342.70) Na⁺ F=0.25%

【0066】

試験例 1

ペプチド二量体による CTL 誘導

実施例 1 にて調製したペプチド二量体の CTL 誘導能を HLA-A24 トランスジェニックマウス (Int. J. Cancer: 100, 565, 2002) を用いて評価した。ペプチド二量体をジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、40mg/ml のペプチド溶液を作

製した。このペプチド溶液 $35\mu\text{l}$ を $581\mu\text{l}$ の 10mM リン酸緩衝液 ($\text{pH} 7.5$) に添加してペプチド懸濁液を調製した。このペプチド懸濁液 $550\mu\text{l}$ とMontani de ISA51 (Seppic社) $700\mu\text{l}$ を連結したガラスシリンジを用いて混合し、エマルションを作製して投与液を調製した。

投与液 $200\mu\text{l}$ をHLA-A24トランスジェニックマウスの尾根部皮下に投与した。マウスは3匹用いた。投与7日後に脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。脾細胞の一部を $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド二量体で1時間パルスした。ペプチドをパルスしていない脾細胞を24穴プレートに 7×10^6 個/wellで播種し、更に上記のペプチドをパルスした脾細胞を 1×10^6 個/well添加して培養した。培養液には、RPMI1640培地に10%FCS、 10mM HEPES、 20mM L-グルタミン、 1mM ビルビン酸ナトリウム、 1mM MEM非必須アミノ酸、1% MEMビタミン、 $55\mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを含ませ、5日間培養した。

培養した脾細胞中の投与ペプチド特異的なCTLの活性を ^{51}Cr リリースアッセイ (J. Immunol.: 159, 4753, 1997)により測定した。標的細胞としては、HLA-A24とH-2K^bのキメラのMHCクラスI分子(Int. J. Cancer: 100, 565, 2002)を安定的に発現するようにマウスリンパ腫由来細胞株EL-4細胞(ATCC株番号TIB-39)に遺伝子導入して作製した細胞株EL-4-A2402/K^bを用いた。標的細胞は $3.7\text{Mq}/10^6$ 個で ^{51}Cr ラベル後、前記ペプチドを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加して更に1時間パルスした。またペプチド非パルスの標的細胞を2時間 ^{51}Cr ラベルしてコントロール標的細胞とした。これらのラベルされた標的細胞と先に調製された脾細胞を1:120の割合で混合して4時間培養し、傷害を受けた標的細胞の割合よりCTL活性を求めた。結果を図1に示した。前記ペプチドを投与したマウスより調製した脾細胞は、ペプチドをパルスした標的細胞を強く傷害したが、コントロールのペプチドをパルスしていない標的細胞に対する傷害性は弱かったことから、ペプチド特異的CTLが誘導されていることが明らかとなった。

【0067】

【発明の効果】

本発明により、インビボにおいてCTL誘導活性を有するペプチド二量体およびそれを有効成分として含有する医薬組成物が提供される。本発明は、多くの癌患

者の病態の改善に有効であると考えられる。

【 0 0 6 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Haruo Sugiyama

Chugai Seiyaku Kabushikikaisha

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Dimerized peptides

<130> 186844

<140>

<141>

<160> 71

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro

1

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala

20

25

30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr

35

40

45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro

50

55

60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly

65

70

75

80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe

85

90

95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe

100

105

110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe

115

120

125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile

130

135

140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr

145

150

155

160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe

165

170

175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
435 440 445

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 2

Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 3

Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys

1

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 4

Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 5

Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 6

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 7

Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 8

Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 9

Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 10

Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile

1

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 11

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 12

Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 13

Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 14

Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met

1

5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 15

Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 16

Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 17

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 18

Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe

1

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 19

Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr

1

5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 20

Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 21

Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu

1

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 22

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 23

Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 24

Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe

1

5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 25

Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys

1

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 26

Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg

1

5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 27

Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 28

Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 29

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys

1

5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 30

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg

1

5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 31

Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg

1

5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 32

Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg

1

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 33

Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu

1

5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 34

Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp

1

5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 35

Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala

1

5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 36

Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met

1

5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 37

Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe

1

5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 38

Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr

1

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 39

Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala

1

5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 40

Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala

1

5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 41

Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala

1

5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 42

His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe

1

5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 43

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu

1

5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 44

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 45

Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu

1

5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 46

Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu

1

5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val

1

5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 48

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala

1

5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 49

Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe

1

5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 50

Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr

1

5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 51

Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser

1

5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 52

Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser

1

5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 53

Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile

1

5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 54

His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys

1

5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 55

Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys

1

5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 56

Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro

1

5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 57

Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr

1

5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 58

Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe

1

5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 59

Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser

1

5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 60

Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser

1

5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 61

Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr

1

5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 62

Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala

1

5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 63

Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe

1

5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 64

Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala

1

5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 65

Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser

1

5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 66

Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala

1

5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 67

Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp

1

5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 68

Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp

1

5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 69

His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala

1

5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 70

Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys

1

5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 71

Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr

1

5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

Xaa at position 2 means Tyr, Phe, Met or Trp, and Xaa at position
9 means Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 72

Cys Xaa Thr Trp Asn Gln Met Asn Xaa

1

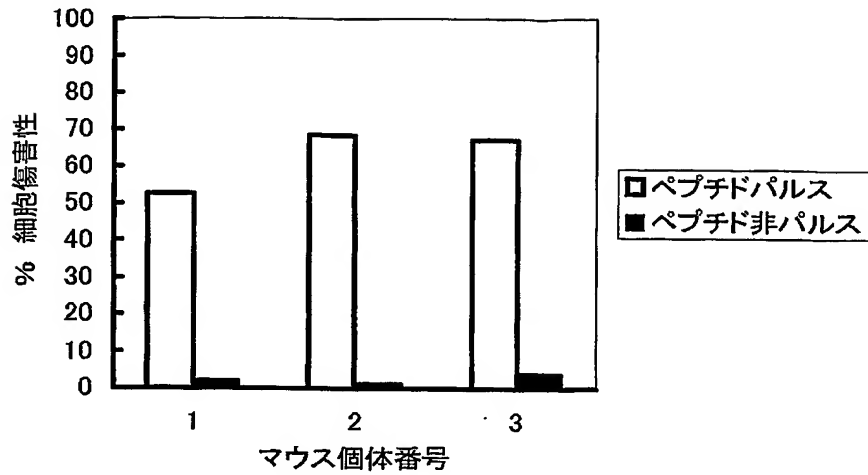
5

【図面の簡単な説明】

【図 1】 トランスジェニックマウスにおけるペプチド二量体（配列番号：
4 4）によるCTL誘導の結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新たな癌抗原ペプチドおよび当該癌抗原ペプチドの癌ワクチンを提供する。

【解決手段】 少なくとも 1 つのシステイン残基を含みかつ 7 ～ 3 0 個のアミノ酸残基からなる、癌抗原ペプチドを生じさせる 2 つのペプチド単量体がジスルフィド結合により結合しているペプチド二量体に関する。

【選択図】 なし

特願 2003-007122

出願人履歴情報

識別番号

[595090392]

1. 変更年月日

1995年 6月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府箕面市船場西2-19-30

氏 名

杉山 治夫

特願 2003-007122

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日

1990年 9月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名

中外製薬株式会社

特願 2003-007122

ページ： 3/E

出願人履歴情報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社